

学校编号: 10384

学号: 200326086

分类号_____密级_____

UDC_____

厦门大学
硕士学位论文

**Midkine 新亚型和相应 RNA 新剪切形式的发现：
它在小鼠胚胎发育与肿瘤生成过程中表达与功能初探**

Identification of novel isoforms of midkine and their
corresponding novel RNA splicing: an inquiry into
midkine expression and function during mouse
embryogenesis and tumorigenesis

陈 琴

指导教师姓名: 李智星 教授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2006 年 6 月 21 日

论文答辩日期: 2006 年 7 月 21 日

学位授予日期: 2006 年 月 日

答辩委员会主席: 李宝安 教授

评 阅 人: 李根喜、卢圣栋教授

2006 年 7 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文而产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版,有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅,有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索,有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1、保密 (), 在 年解密后适用本授权书。

2、不保密 (☒)

(请在以上相应括号内打“√”)

作者签名:

日期: 年 月 日

导师签名:

日期: 年 月 日

摘要

Midkine (MK) 是一类肝素结合生长/分化因子, 是小鼠胚胎发育中视黄酸诱导的早期表达基因之一。迄今研究表明, MK 具有较广泛的生物学功能, 如它参与了生长、分化、血管生成和细胞凋亡等过程。它不仅与胚胎发育有关, 与癌变、肿瘤生成也密切相关。

为了研究 MK 在组织分化和器官生成中的表达情况和潜在的功能, (一) 我们首先通过免疫组化方法研究 MK 在空间上的表达行为。结果我们首次发现, 在组织器官(胰脏和肾脏等)的发育分化过程中, (1)MK 主要富集于上皮(epithelial)–间充质 (mesenchymal) 界面处; (2) 尤其是在接近新生血管的界面处; (3) 而且, MK 的表达随细胞的分化/成熟度的增加而降低; 并且, 它的表达在未分化上皮干细胞的基膜处维持最高, 而随着细胞的分化和成熟而降低。这些揭示了它在组织器官发育分化过程中普遍存在的上皮–间充质相互作用, 在最近发现的新生血管对组织分化的诱导作用的信号传导, 以及对调节干细胞的自我更新/增殖与分化的平衡等方面都发挥一定的作用。

(二) 然后, 我们用 RT-PCR 的方法检测 MK 在时间上的表达行为。为了提高 PCR 反应的灵敏度和专一性, 我们采用了巢式(Nested)、直降 (Touchdown) PCR 的方法。结果, (1) 我们不仅发现 MK 的表达随胚胎发育而受调制, 即在 E6.5 至 E15.5 期间有明显表达, 而在此区间前后, 则表达甚微; (2) 我们还首次检测到, MK 的截短型(truncated, tMK)在正常胚胎发育过程中的某些器官(如胰脏和肝脏)发育的特定阶段(如 E11.5 至 E12.5)有明显表达。在此之前, tMK 一般只在肿瘤和癌症组织中被检测到, 并一直被普遍认为, tMK 参与诱变癌症/肿瘤, 而作为检测癌症/肿瘤的一种标志。因此, 我们的发现, 为研究 MK 在肿瘤生成和癌变中的机理, 提供了新视野; (3) 随后, 用同样的技术, 我们又发现了在小鼠正常器官发育的特定阶段(如 E11.5 至 E12.5 的胰脏和肝脏), MK 的另外两种新截短型, 分别称 tMK-B 和 tMK-C。它们在 E8.5 和 E14.5 及其前后均没有表达。这表明它们在器官形成中具有某种独特的功能; (4) 分析表明, 这三种截短型, 首次在小鼠中检测到; (5) 并且, 虽然 tMK-C 相应的截短型(缺失一个完整的外显子)在人体病变组织中的表达已有报道, 但 tMK-A 和 tMK-B 则是全新的截短型; (6) 有趣的是, 它们(tMK-A, tMK-B 和 tMK-C)的剪切位点序列具有特异性, 3'

和 5' 端剪切位点碱基序列相同,即 tMK-A 的 3' 和 5' 端剪切位点序列为-AGTG-、tMK-B 为-GACC-、tMK-C 则为-AGCC-。这是首次发现具有序列专一性的 mRNA 剪切模式。从基因结构上看, tMK-A、tMK-B 缺失了外显子 III 和 IV 的部分, tMK-C 缺失了外显子 IV。可见,这里很可能存在着一种新的 mRNA 剪接加工的分子机制。总结这方面的表达研究,我们不仅验证了 MK 在正常胚胎发育中的调控表达,而且首次发现了截短型 MK 在正常发育中的特异表达。这些对揭示 MK 在发育分化中的功能和分子机理,提供了新思路。综合实验室研究,在人类癌变组织中 MK 表达的新发现(MK 也存在三种截短型),这些研究将有利于认清 MK 在肿瘤生成和癌变过程中的作用和潜在分子机制(如可能是由于新的剪切方式的突变而造成癌变等)。

(三) 为了进一步探究 MK 功能的分子机理,我们克隆了 MK 及其截短型,并通过表达载体 PET28a 在 BL21 菌中表达,以研究 MK 及各种截短型的分子活性。初始结果表明, MK 及其截短型,对成纤维肿瘤细胞的迁移(migration),形态发生和增殖有一定作用。这些结果为进一步更广泛(如其它细胞系、条件等)、更深入(分子机理和细胞行为)的研究奠定了基础。

关键词: Midkine; 截短型; 胚胎发育。

Abstract

Midkine (MK) is a heparin-binding growth/differentiation factor. It is an early responded gene under retinoid acid induction during mouse embryogenesis. MK has been shown to be involved in a variety of biological processes, such as growth, differentiation, angiogenesis and apoptosis. It not only plays a role in embryogenesis but also is closely related to tumorigenesis/carcinogenesis.

To study the expression and function of MK during organogenesis and tissue differentiation, we examine the spatial expression of MK in mouse embryogenesis by immunohistochemistry. It turns out that during (pancreas & kidney) tissue differentiation, MK is concentrated on the epithelial-mesenchymal interface especially at the areas proximal to the nascent blood vessels and its expression level decreased with the cellular differentiation/maturity, i.e., its expression level peaked at the stem basal membrane of the undifferentiated cells and attenuated with the differentiation of cells. These expression patterns imply its function in the ubiquitous epithelial/mesenchymal interactions in organogenesis and tissue differentiation, in the signaling pathway in the recent identification of nascent blood vessel induction of tissue differentiation as well as in the regulation of the balance of stem cell self-renewal/proliferation vs differentiation.

We further investigate MK' s temporal expression during embryonic development by RT-PCR. We have applied nested-touchdown PCR strategy to increase the specificity and sensitivity of PCR. In the end, (1) we have not only found that MK expression is regulated in embryogenesis, i.e., it is significantly expressed between E6.5 and E15.5 with little expression outside this period; (2) We have also first detected the

expression of truncated MK (tMK) at specific stages (E11.5 and E12.5 of pancreas & liver) organogenesis during normal embryonic development. It had been widely held before that tMK had been detected in human tumor/cancer tissues and that the expression of tMK could be used as a marker for tumorigenesis/carcinogenesis. Thus, our data have provided a new angle for the study of the role of MK in tumorigenesis/carcinogenesis;

(3) Shortly, using the same approach, we have detected additional two truncated MK transcripts, termed tMK-B & tMK-C respectively, to be differentially expressed (between E11.5 and E12.5, no expression at E8.5 or E14.5) during (pancreas & liver) organogenesis, implying its specific role in organogenesis;

(4) Our search indicates that these truncated transcripts had not been detected in the mouse before;

(5) Furthermore, although the corresponding truncation (lack one entire exon) of tMK-C has been reported in human tumor/cancer tissues. For tMK-A & tMK-B, they are so far the de novo truncations identified;

(6) Intriguingly, the three truncations (tMK-A, tMK-B and tMK-C) seem to have resulted from sequence-specific RNA splicing, in which cases the 5' splicing donor and 3' receptor at the alternative splicing site is sequence specific, namely for tMK-A, the sequence is AGTG, for tMK-B, the sequence is GACC and for tMK-C, the sequence is AGCC. To our best knowledge, this is the first report of this type of sequence-specific RNA splicing. From MK gene structure, it shows that tMK-A and tMK-B are resulted from partial deletion of exon III and IV while tMK-C is from the deletion of exon IV. All of these suggest that there is potentially a novel splicing mechanism underlying this type of truncation. In summary of these mRNA-based discoveries, we have not only examined the differentially regulated MK expression, but also first discovered the specific expression of truncated MK transcripts in normal development. These have provided novel avenues for the study of MK function and molecular mechanism in embryonic

development. Together with our lab' s other findings on the expression MK in human carcinogenesis (also three truncated MKs identified), these observations could help clarify the role and mechanism of MK in tumorigenesis/carcinogenesis (for instance, carcinogenesis could be originated from the mutations in the newly identified truncations).

To further pursue the molecular basis for MK function, full length and its truncated MKs were cloned onto expression vector PET28a and expressed in BL21 for the study of their molecular activities. Preliminary studies show that MK and its truncated isoforms have some effects on the migration, morphogenesis and proliferation/survival in the fibroblast tumor cells. These have laid a foundation for further (with more cell lines, conditions and on molecular mechanism and cellular behaviors) study of diverse MK functions.

Key Words: Midkine(MK); Truncated MK; Embryogenesis.

目录

中文摘要	i
英文摘要	iii
前言	1
一. MK 分子生物学特性与蛋白结构	1
二. MK 的生物学功能	3
1. 神经营养活性.....	3
2. 修复受损组织和促进血管生成.....	3
3. 促纤溶活性.....	4
4. 促生长分化功能.....	4
5. 其他.....	4
三. MK 的分布.....	5
四. MK 与疾病的关系.....	5
1. MK 与肿瘤/癌变的关系.....	5
2. MK 与老年痴呆 (Alzheimer's Disease)	6
3. MK 与 HIV.....	6
4. 其他.....	7
五. 截短型 (truncated) MK 发现及生物学特性.....	7
六. 展望.....	8
材料与方法.....	9
一. 生物材料与主要实验仪器、试剂.....	9
1. 生物材料.....	9
2. 主要仪器.....	9
3. 主要试剂来源.....	10
二. 主要试剂配制.....	10
1. LB 培养基配制.....	10
2. 1mol/L CaCl ₂ 贮存液配制.....	10
3. 质粒抽提/裂解缓冲液配制.....	10

4. 0.1mol/L IPTG (异丙基- β -D-硫代半乳糖苷) 配制.....	10
5. 考马司亮蓝染液配制.....	11
6. 2 \times SDS 凝胶加样缓冲液配制.....	11
7. 15%SDS 聚丙烯酰胺凝胶配制.....	11
8. 磷酸缓冲溶液 (PBS) 配制.....	11
三. 实验方法.....	11
1. 解剖.....	11
2. 免疫组化.....	12
3. RNA 提取.....	12
4. RT-PCR.....	13
5. PCR 产物回收.....	15
6. 克隆转化.....	15
7. 质粒提取	17
8. 酶切鉴定并测序.....	17
9. 表达载体的构建.....	18
10. 诱导表达.....	18
11. 表达蛋白提取.....	19
12. 蛋白活性测定	20
实验结果及分析.....	21
一. MK 在小鼠胚胎发育中的表达.....	21
二. 截短型 MK 特异表达于正常器官形成中某个时期.....	22
三. 新截短型 MK 克隆和测序分析.....	23
四. MK 在组织分化和干细胞更新分化中功能.....	25
五. MK 在干细胞中的表达.....	26
六. tMK-B 和 tMK-C 的发现.....	27
七. PET-tMK 及 PET-MK 重组载体的构建及诱导表达.....	31
八. 功能鉴定.....	32
讨论.....	35
一. MK 的表达与分布.....	35

二. MK 及截短型 MK (tMK) 在肿瘤中的表达.....	36
三. 小鼠 MK 及截短型 MK.....	36
四. 新的剪接形式.....	38
五. 功能.....	38
结语.....	40
参考文献	41
附录一.....	47
附录二.....	48
致谢.....	50

Table of Contents

Chinese abstract.....	i
English abstract.....	iii
Background.....	1
一. MK molecular biology features and its protein structure.....	1
二. MK biological activities.....	3
1. Neurotrophic activity.....	3
2. Activity in tissue repair and angiogenesis.....	3
3. Fibrinolytic activity.....	4
4. Growth and differentiation promoting activity.....	4
5. Others	4
三. MK' s distribution.....	5
四. MK and diseases	5
1. MK and tumorigenesis/carcinogenesis.....	5
2. MK and Alzheimer' s Disease.....	6
3. MK and HIV.....	6
4. Others.....	7
五. The detection of truncated MK and its biological activity.....	7
六. Prospect	8
Materials and methods.....	9
一. Biomaterials, main experimental apparatus and reagents	9
1. Biomaterials.....	9
2. Main apparatus	9
3. Sources for main reagents	10
二. Main reagent preparation.....	10
1. LB culture medium preparation.....	10
2. 1 mol/L CaCl ₂ stock preparation.....	10
3. Plasmid extract/lysis buffer preparation	10

4. 0.1 mol/L IPTG preparation.....	10
5. Commassiae blue staining solution preparation	11
6. 2×SDS gel loading buffer preparation.....	11
7. 15% SDS-PAGE gel preparation.....	11
8. PBS preparation.....	11
三. Experimental methods.....	11
1. Tissue dissection	11
2. Immunohistochemistry.....	12
3. RNA isolation	12
4. RT-PCR.....	13
5. PCR product extraction.....	15
6. Cloning and transformation.....	15
7. Plasmid purification.....	17
8. Enzyme cut and sequence.....	17
9. Expression vector construction.....	18
10. Induce expression.....	18
11. Fusion protein preparation.....	19
12. Protein activity assay.....	20
Results and analysis.....	21
一. MK expression in mouse embryonic development.....	21
二. tMK transiently expressed during normal organogenesis.....	22
三. Cloning and sequence analysis of novel tMK.....	23
四. MK function during organogenesis and stem cell self-renewal vs. differentiation.....	25
五. MK expression in pancreatic stem cells.....	26
六. Discovery of tMK-B and tMK-C.....	27
七. Construction of PET-tMK and PET-MK recombination vectors and their induced expressions in BL21.....	31
八. Functional test.....	32

Discussion	35
一. MK expression and distribution.....	35
二. The expression of MK and tMK in tumors/cancers.....	36
三. Mouse MK and tMK.....	36
四. Novel splicing transcripts.....	38
五. Function.....	38
Closing Remarks	40
References	41
Appendices one	47
Appendices two	48
Acknowledgements	50

前言

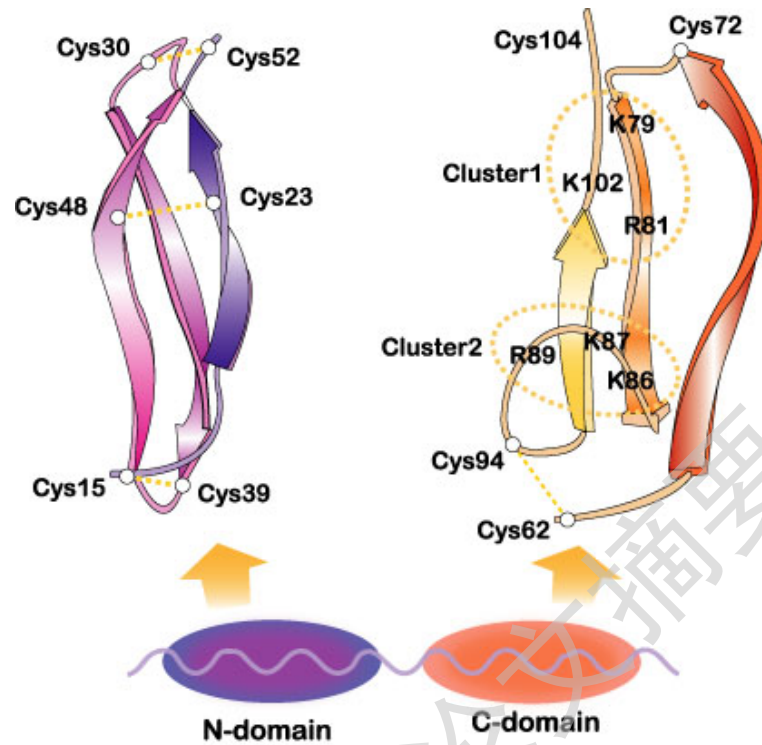
生长因子是控制细胞分化和增殖的重要因素，与胚胎发生、肿瘤形成密切相关。孕中期肾因子（Midkine, MK）是一类肝素结合生长/分化因子，1988 年 Muramatsu 等从视黄酸诱导的小鼠胚胎瘤细胞系 HM-1 细胞 cDNA 文库中筛选出的一种新的基因^[1]。该基因的 mRNA 在鼠孕中期（midgestation）强烈表达^[2,3]，出生后，主要在肾（kidney）中表达，故命名为 midkine。随后又发现了可与肝素结合的生长/分化因子，1990 年 Li^[4] 命名为多效生长因子（Pleiotrophin, PTN），它与孕中期因子组成 Midkine 家族^[5]。

一. MK 分子生物学特性与蛋白结构

MK 是一个分子量为 13kDa 的低分子多肽，富含碱性氨基酸和半胱氨酸，与 PTN 具有 50% 的蛋白同源性^[5,6]。人类 MK 与小鼠 MK 的同源性为 87%，所有的氨基酸改变都是保守的，只是人类 MK 多肽的 N 端插入了一个长度为三个氨基酸的残基^[7]。

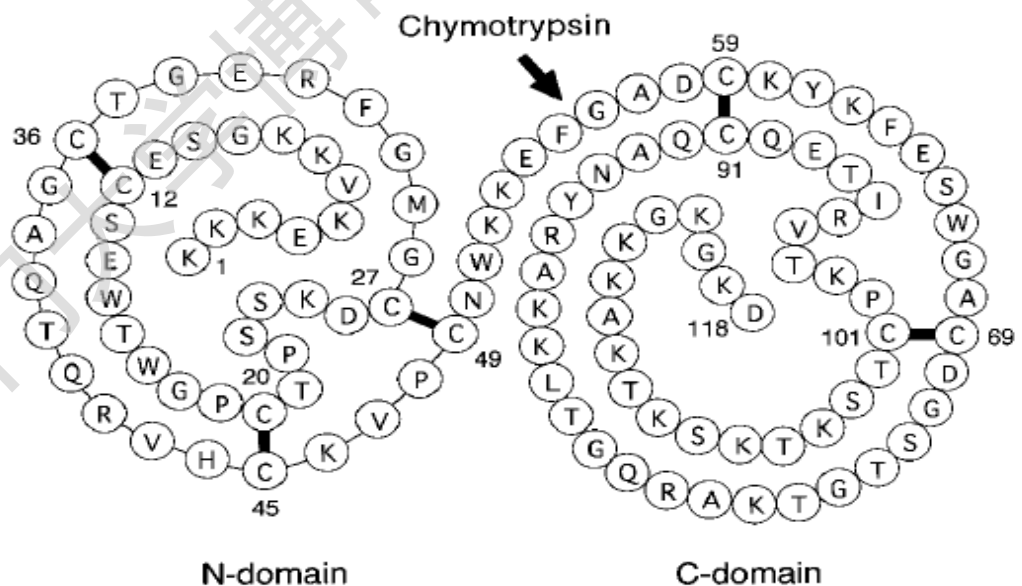
MK 基因由五个外显子组成，一个非编码和四个编码外显子，从第二个外显子开始转录，外显子 III、IV 编码核心区域的氨基酸残基^[8,9]。人的 MK 基因位于染色体 11p11.2^[10]，而鼠的 MK 基因位于染色体 2^[11,12]。从 cDNA 开放阅读框架序列可以分析推测出 MK 前体 N 端含有 22 个信号肽序列，从蛋白序列可分析出 MK 是个碱性很强的蛋白，可见 MK 是个典型的可分泌性碱性蛋白。

如图一和图二，MK 蛋白具有两个结构域，N-和 C-端，两者之间还存在一个铰链区。Phe55 位于中间铰链区而暴露于分子表面，而 Phe55 是糜蛋白酶特异酶切位点，因此，糜蛋白酶可以把完整的 MK 蛋白切成大小相近的两个分子，即 N-端和 C-端分子大小是相近的^[13]。由图一可以看出，每个结构域都是由三条反平行 β 折叠链组成。MK 蛋白含有 10 个保守的半胱氨酸，均形成二硫键，分别是 C12-C36, C20-C45, C27-C49, C59-C91, C69-C101^[14]。在这样小分子蛋白质中就有五个二硫键，可见 MK 蛋白具有高度稳定性和严格的三维结构。MK 分子是一个耐热、耐酸的稳定多肽^[15]。



The domain organization of midkine and three dimensional structure of the domains.
This picture comes from internet (www.midkine.org).

图一：人 MK 蛋白结构域组成及三维结构



Schematic representation of domain structure of mouse MK molecule. 1-49, N-domain; 50-58, hinge region; 59-118, C-domain. Chymotrypsin cleaves specifically at Phe55 of intact molecule. (Matsuda et al., 1996).

图二：小鼠 MK 分子结构域示意图。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库